

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000619

International filing date: 12 January 2005 (12.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-005489
Filing date: 13 January 2004 (13.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

12.01.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 1月13日

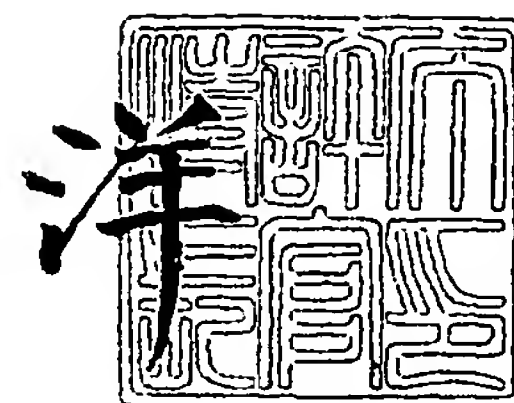
出願番号
Application Number: 特願2004-005489
[ST. 10/C]: [JP2004-005489]

出願人
Applicant(s): 東レ株式会社
イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー

2005年 2月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-301142

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP-1402
【提出日】 平成16年 1月13日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 D01F 9/00
A01K 67/00
C12N 5/00

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社先端融合研究所
内
【氏名】 平松 紳吾

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社先端融合研究所
内
【氏名】 森山 裕充

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社先端融合研究所
内
【氏名】 浅岡 良太

【発明者】
【住所又は居所】 愛知県名古屋市港区大江町 9 番地の 1 東レ株式会社名古屋事業
場内
【氏名】 守田 健

【発明者】
【住所又は居所】 愛知県名古屋市港区大江町 9 番地の 1 東レ株式会社名古屋事業
場内
【氏名】 田中 貴

【発明者】
【住所又は居所】 愛知県名古屋市港区大江町 9 番地の 1 東レ株式会社名古屋事業
場内
【氏名】 山田 勝成

【発明者】
【住所又は居所】 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 6 3, オックスフォード
, サギノーロード 8 7 1
【氏名】 ジョン・フィリップ・オブライエン

【発明者】
【住所又は居所】 アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 3, ウイルミントン, マウ
ントレバノンロード 7 1 9
【氏名】 ステファン・アール・ファーネストック

【特許出願人】
【識別番号】 000003159
【氏名又は名称】 東レ株式会社

【特許出願人】
【識別番号】 390023674
【氏名又は名称】 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー

【代理人】
【識別番号】 100091731
【弁理士】
【氏名又は名称】 高木 千嘉
【電話番号】 03-3261-2022

【選任した代理人】
 【識別番号】 100080355
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 西村 公佑
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100127926
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 結田 純次
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100105290
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 三輪 昭次
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015565
 【納付金額】 21,000円
 【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

一対のフィブロインH鎖遺伝子をもつ遺伝子組換えカイコにより作られ、絹糸のフィブロインH鎖タンパク質の基本的な構造を本質的に保持することを特徴とするクモ糸タンパク質を含む絹糸。

【請求項 2】

クモ糸タンパク質がフィブロインタンパク質中に分散して存在することを特徴とする請求項 1 に記載の絹糸。

【請求項 3】

クモ糸タンパク質がフィブロインH鎖タンパク質に含まれるポリペプチドと融合していることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の絹糸。

【請求項 4】

クモ糸タンパク質が、フィブロインH鎖タンパク質のN末端部分とC末端部分の間に挿入されており、C末端部分に含まれるシステインを介してフィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合していることを特徴とする請求項 3 に記載の絹糸。

【請求項 5】

クモ糸タンパク質の含量が 0.1～25 重量%である請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の絹糸。

【請求項 6】

クモ糸タンパク質の含量が 1～15 重量%である請求項 5 に記載の絹糸。

【請求項 7】

クモ糸タンパク質の含量が 1～10 重量%である請求項 6 に記載の絹糸。

【請求項 8】

クモ糸タンパク質が、配列番号 1 のペプチドまたは配列番号 1 において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の絹糸。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のペプチドが 3～30 回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の絹糸。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のペプチドが 4～16 回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項 9 に記載の絹糸。

【請求項 11】

クモ糸タンパク質が、配列番号 2 のペプチドまたは配列番号 2 において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の絹糸。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のペプチドが 3～30 回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項 11 に記載の絹糸。

【請求項 13】

請求項 11 に記載のペプチドが 4～16 回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項 12 に記載の絹糸。

【請求項 14】

クモ糸タンパク質が請求項 8 に記載のペプチドおよび請求項 11 に記載のペプチドの両方を含むことを特徴とする請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の絹糸。

【請求項 15】

クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分が配列番号 3 のペプチドまたは配列番号 3 において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつ 2 または 3 個のシステインを有するペプチドであることを特徴とする請求項 4～14 のいずれか 1 項に記載の絹糸。

【請求項 16】

クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のN末端部分が配列番号4のペプチドまたは配列番号4において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたペプチドであって、該ペプチドをコードする遺伝子がプロモーターによる外来タンパク質の発現を増強する機能を保持するペプチドであることを特徴とする請求項4～15のいずれか1項に記載の絹糸。

【請求項 17】

クモ糸タンパク質が選択マーカーとなるタンパク質と融合していない請求項1～16のいずれか1項に記載の絹糸の絹糸。

【請求項 18】

一对のフィブロインH鎖遺伝子を有し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子が一对のフィブロインH鎖遺伝子以外の領域に導入された請求項1～17のいずれか1項に記載の絹糸を作る遺伝子組換えカイコ。

【請求項 19】

遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーターを有することを特徴とする請求項18に記載の遺伝子組換えカイコ。

【請求項 20】

遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーター及びその上流領域を有することを特徴とする請求項18に記載の遺伝子組換えカイコ。

【請求項 21】

フィブロインH鎖遺伝子プロモーター下流に、フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン全長またはその一部・第二エキソン領域の一部が連結されていることを特徴とする請求項19または20に記載の遺伝子組換えカイコ。

【請求項 22】

トランスポゾンを利用する請求項18～21のいずれか1項に記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

【請求項 23】

トランスポゾンがpiggyBacトランスポゾンであることを特徴とする請求項22に記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

【請求項 24】

請求項18～21のいずれか1項記載の遺伝子組換えカイコにより作らせることを特徴とする絹糸の製造方法。

【請求項 25】

請求項1～17のいずれか1項記載の絹糸を用いた織物。

【書類名】明細書

【発明の名称】クモ糸タンパク質を含む絹糸および該絹糸を産生するカイコ

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子組換えカイコにより作られるクモ糸タンパク質を含む絹糸、該遺伝子組換えカイコ、ならびに該遺伝子組換えカイコによる絹糸の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

強度および耐久性を損なうことなく、軽量かつしなやかさの両方を兼ね備える材料および布についての需要は常に増加しており、クモ糸が数々の所望される特性を有することが示されている。円網を作る種類のクモは、6本の異なる種類の腺組織からシルクを産生することができ、6本の繊維の各々は異なる機械的特性を有することが知られている。Major amullate gland (大嚢状腺) と Minor amullate gland (小嚢状腺) から作り出されるクモ糸 (スパイダーシルク) は、牽引糸、ドラグラインと呼ばれている。牽引糸は高い引っ張り強度と高い伸度を示す (非特許文献1) ことから、幅広い産業用途への展開が期待されている (非特許文献2)。また、Flagelliform gland (鞭毛状腺)、Aggregate gland (聚状腺) から作られるクモ糸は、一般に横糸となり、粘着性と高い伸度を示す (非特許文献3)。

【0003】

このようにクモ糸は、鋼鉄よりも強い引張強さを示すものおよび羊毛よりも強い耐屈曲性を有するものがあり、さらに K E V L A R (登録商標) よりも大きなエネルギー対ブレイク限界を特徴とするものも知られている。特に牽引糸は 200ksi を越える引張強さを有し、ほぼ 35% の耐屈曲性を伴う。これらの特徴が付与されたとすると、クモ糸を様々な織物用適用のための軽量高強度繊維として使用することができる。

【0004】

またクモ糸は、最高 100℃ まで安定であるため、これらの繊維を使用して熱注入化プラスチックを補強することができる。これらのタンパク質はフィルムもしくはコーティングの形態でも価値がある可能性がある。さらに、クモ糸はアミノ酸を構成成分とするタンパク質でもあり、自然界において分解されるという利点も兼ね備えている。

【0005】

天然のクモ糸タンパク質としては、spidroin1 (MaSpI) や spidroin2 (MaSpII) (非特許文献4)、ADF-3、ADF-4などが知られている。これらクモ糸タンパク質の持つ特徴的な配列として、アラニン、セリン、およびグリシンにより大半が占められるアミノ酸でできおり、かつグルタミン、チロシン、ロイシン、およびバリンのような他のアミノ酸の相当量を有することが挙げられる。spidroin1は反復配列を有しており、反復単位は最大34アミノ酸長であり、そして厳密には保存されない。この反復単位は2つの異なるセグメント、つまり (i) 5~7残基のポリアラニン配列により大半が占められる10アミノ酸セグメント、(ii) 配列内で保存されるが、ただし多くの反復単位中に複数回の3アミノ酸の欠損を有する24アミノ酸セグメントからなる。後者の配列は主に Gly-Xaa-Gly モチーフからなり、Xaaはアラニン、チロシン、ロイシン、もしくはグルタミンである。Spidroin2も反復配列を有し、反復単位は最大51アミノ酸長であり、そしてやはり厳密には保存されない。この反復配列は2つの異なるセグメント、つまり (i) 6~9残基のポリアラニン配列により大半が占められるセグメント、(ii) GlyGlyTyrGlyProGlyもしくは GlyProGlyGlnGln といったアミノ酸配列を含むセグメントからなる。

【0006】

天然のクモ糸タンパク質、とくに牽引糸の主要構成タンパク質である spidroin1 は、アラニン、セリン、グリシン、グルタミン、チロシン、ロイシン、アルギニン、イソロイシン、バリンを構成成分とするポリペプチドからなることが知られている。マイナー成分である spidroin2 の配列中には、spidroin1 と比較してプロリンが多く含まれることが知られており、プロリンはターンおよびよじれ構造に寄与すると考えられている。

【0007】

これらの特徴を保持した人工的に合成、デザインされた遺伝子として、それぞれDP-1B、DP-2A（非特許文献4）が知られている。

【0008】

しかしクモは集団で飼育することが困難であり、直接クモから大量の糸を調製することは困難である。また、天然のクモ糸を可溶化および精製することもまた困難で、クモ糸は例えばLiSCN、LiClO₄、もしくは88% (vol/vol) のギ酸のような非常に苛酷な試薬以外では不溶性である。いったん溶解しても、透析する場合、もしくは典型的な緩衝液で希釈する場合、クモ糸を構成しているクモ糸タンパク質は沈殿してしまう。さらに、クモにより作られるクモ糸は、クモ糸の種類に応じて糸の性質が異なっており、所望の性質を持つクモ糸を分離することはなお困難である。こうした要因により、商業的に有用な量のクモ糸タンパク質を天然の源から適度なコストで入手することを不可能なものとしている。

【0009】

そこで近年は遺伝子組換え技術を用いて、いくつかの生物を、クモ糸タンパク質を作るように改変する試みがなされている。例えば大腸菌や酵母といった微生物にクモ糸タンパク質を作らせる試み（特許文献1および非特許文献4）や、タバコやポテトといった植物を用いる試み（非特許文献5）、ほ乳類細胞を用いる手法や、遺伝子組換えヤギを用いて乳中や尿中に産生させる手法（特許文献2）が行われている。しかしこれら遺伝子組換え体を用いたクモ糸タンパク質の産生では、産生されたクモ糸タンパク質を抽出、精製し、人工的に紡糸する必要がある（非特許文献1）、人工的な紡糸には手間やコストがかかり、各種溶媒を用いることによる環境負荷の課題もある。

【0010】

そうした中、精製および／または人工的な紡糸工程を必要とせず、クモ糸を構成するタンパク質を含む繊維を直接生産するための方法として、遺伝子組換えカイコを用いた緑色蛍光タンパク質とクモ糸タンパク質の融合タンパク質を含んだ絹糸を生産する手法が開示されている（特許文献3）。この手法は、カイコ卵へ、エレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質とクモ糸タンパク質を模したタンパク質の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入し、相同組換えにより組換え体を取得するものである。しかしこの手法では、遺伝子を組換えしていないカイコの作る絹糸と比較して、強度および伸度が低下した絹糸しか生産することができない。

【0011】

この原因として、1. 相同組換えにより遺伝子を導入することから、カイコの持つ本来の一对のフィブロインH鎖遺伝子の少なくとも一方が破壊されてしまう、2. 組換え体選抜のため、緑色蛍光タンパク質を融合タンパク質として発現させる必要があり、クモ糸タンパク質の性質を損なう可能性がある、3. デザインされたクモ糸タンパク質が高強度、高伸度といった性質を持ち得ない配列であった、などの可能性が考えられる。

【特許文献1】特表平8-511426号公報

【特許文献2】特表2002-506642号公報

【特許文献3】国際公開第02/40528号パンフレット

【非特許文献1】Science、2002年、第295巻、p472~476

【非特許文献2】Nature、2001年、第410巻、p541~548

【非特許文献3】大崎茂芳、クモの糸の化学、有機合成化学、（日本）、1985年、第4巻、第9号、p828~835

【非特許文献4】Reviews in Molecular Biotechnology、2000年、第74号、p105~119

【非特許文献5】Nature、2001年、第19巻、p573~577

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明では、高強度、高伸度といったクモ糸の持つ所望の性質を有する絹糸を、各種溶媒を用いることなく、また人工的な紡糸工程を必要としない手法により提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記課題を解決できる手段を鋭意検討した結果、トランスポゾンの機能を用いることでクモ糸タンパク質をコードする遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコが、高強度、高伸度といった所望の性質を持つ、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生することを見出し本発明に至った。

【0014】

すなわち本発明は、以下の(1)～(24)の発明を提供するものである。

(1) 一对のフィブロインH鎖遺伝子をもつ遺伝子組換えカイコにより産生され、絹糸のフィブロインH鎖タンパク質の基本的な構造を本質的に保持することを特徴とするクモ糸タンパク質を含む絹糸。

(2) クモ糸タンパク質がフィブロインタンパク質中に分散して存在することを特徴とする前記発明(1)に記載の絹糸。

(3) クモ糸タンパク質がフィブロインH鎖タンパク質に含まれるポリペプチドと融合していることを特徴とする前記発明(1)または(2)に記載の絹糸。

(4) クモ糸タンパク質が、フィブロインH鎖タンパク質のN末端部分とC末端部分の間に挿入されており、C末端部分に含まれるシステインを介してフィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合していることを特徴とする前記発明(3)に記載の絹糸。

【0015】

(5) クモ糸タンパク質の含量が0.1～25重量%である前記発明(1)～(4)のいずれかに記載の絹糸。

(6) クモ糸タンパク質の含量が1～15重量%である前記発明(5)に記載の絹糸。

(7) クモ糸タンパク質の含量が1～10重量%である前記発明(6)に記載の絹糸。

(8) クモ糸タンパク質が、配列番号1のペプチドまたは配列番号1において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする前記発明(1)～(7)のいずれかに記載の絹糸。

【0016】

(9) 前記発明(8)に記載のペプチドが3～30回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする前記発明(8)に記載の絹糸。

(10) 前記発明(8)に記載のペプチドが4～16回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする前記発明(9)に記載の絹糸。

(11) クモ糸タンパク質が、配列番号2のペプチドまたは配列番号2において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする前記発明(1)～(7)のいずれかに記載の絹糸。

(12) 前記発明(11)に記載のペプチドが3～30回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする前記発明(11)に記載の絹糸。

【0017】

(13) 前記発明(11)に記載のペプチドが4～16回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする前記発明(12)に記載の絹糸。

(14) クモ糸タンパク質が前記発明(8)に記載のペプチドおよび前記発明(11)に記載のペプチドの両方を含むことを特徴とする前記発明(1)～(7)のいずれかに記載の絹糸。

(15) クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分が配列番号3のペプチドまたは配列番号3において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつ2または3個のシステインを有するペプチドであることを特徴とする前記発明(4)～(14)のいずれかに記載の絹糸。

(16) クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のN末端部分が配列番

号4のペプチドまたは配列番号4において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されされたペプチドであって、該ペプチドをコードする遺伝子がプロモーターによる外来タンパク質の発現を増強する機能を保持するペプチドであることを特徴とする前記発明(4)～(15)のいずれかに記載の絹糸。

【0018】

(17) クモ糸タンパク質が選択マーカーとなるタンパク質と融合していない前記発明(1)～(16)のいずれかに記載の絹糸。

(18) 一对のフィブロインH鎖遺伝子を有し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子が一对のフィブロインH鎖遺伝子以外の領域に導入された前記発明(1)～(17)のいずれかに記載の絹糸を作る遺伝子組換えカイコ。

(19) 遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーターを有することを特徴とする前記発明(18)に記載の遺伝子組換えカイコ。

(20) 遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーター及びその上流領域を有することを特徴とする前記発明(18)に記載の遺伝子組換えカイコ。

【0019】

(21) フィブロインH鎖遺伝子プロモーター下流に、フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン全長またはその一部・第二エキソン領域の一部が連結されていることを特徴とする前記発明(19)または(20)に記載の遺伝子組換えカイコ。

(22) トランスポゾンを利用する前記発明(18)～(21)のいずれかに記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

(23) トランスポゾンがpiggyBacトランスポゾンであることを特徴とする前記発明(22)に記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

(24) 前記発明(18)～(21)のいずれかに記載の遺伝子組換えカイコにより作られることを特徴とする絹糸の製造方法。

(25) 前記発明(1)～(17)のいずれかに記載の絹糸を用いた織物。

【発明の効果】

【0020】

本発明により、強度、伸度及び／またはタフネスが向上するといった、優れた特性を有するクモ糸タンパク質を含む絹糸が得られた。また、該絹糸を用いた織物は、その優れた特性から、産業用途例えば、航空、宇宙用途、被服製造、ロープ、外科手術用縫合糸のような所定の種類の高強度使用のため、ならびに移植術(例えば、人工靱体もしくは大動脈用包帯)用の生物材料としてさえ適用可能である可能性がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

この発明におけるその他の用語や概念は、以下の記載において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995等に記載されている。

【0022】

本発明における絹糸とは、カイコガ(*Bombyx mori*)により吐糸される繭を構成するタンパク質を主な主成分とする繊維を示す。好ましくは繭から調製された生糸を示し、さらに好ましくは生糸を精練して得られた絹糸を示し、もっとも好ましくは2粒以上の複数の繭からマルチフィラメントとして操糸された絹糸を示す。カイコの作る絹糸は、フィブロイン層とそれを取り囲むセリシン層から構成されている。

【0023】

本発明における「クモ」とは、クモ目に分類される動物、好ましくは造網性のクモ目に分類される動物を示す。さらに好ましくはオニグモもしくはジョロウグモを示す。

本発明における「クモ糸」とは、「クモ」が作る糸すなわち繊維状のタンパク質であり、具体的には造網性のクモの作る糸すなわち牽引糸、粹糸、繫留糸、卵囊糸、横糸、捕獲帯、付着盤、しおり糸などが挙げられるが、より好ましくは牽引糸、粹糸、縦糸、横糸を示す。

【0024】

本発明におけるクモ糸タンパク質とは、クモ糸を構成するタンパク質もしくはクモ糸を構成するタンパク質の特徴を持つタンパク質のことである。天然のクモ糸タンパク質と全く同じ配列である必要はなく、人工的にデザイン、合成されたタンパク質であっても良い。天然のクモ糸タンパク質は分子量が巨大であることから、天然のクモ糸タンパク質を作る遺伝子も同様に巨大である。効率的に取り扱うためには、遺伝子の短縮、欠失、置換を行うことが望ましい。また、天然のクモ糸タンパク質の持つ特徴的な配列を持つ人工的な類似タンパク質を作るように設計、デザインされた人工的な遺伝子であっても良い。

【0025】

好ましくはDP-1B、DP-2Aに含まれる少なくともアミノ酸5残基以上の配列を持つタンパク質をクモ糸タンパク質として用いることができる。さらに好ましくはクモ糸索引糸のもつ強度、伸度といった所望の性質を絹糸に付与するには、主要構成タンパク質であるspidroin1のアミノ酸配列を模倣することが望ましい。つまり本発明におけるクモ糸タンパク質は、アラニン、セリン、グリシン、グルタミン、チロシン、ロイシン、アルギニン、イソロイシン、バリンを構成成分とすることが望ましく、さらに好ましくはDP-1Bによりコードされる配列番号1に記載の配列、または「クモ糸タンパク質に特有の反復配列」・「DP-2Aのコンセンサス配列」・「絹糸に特有の反復配列」の順で構成された配列番号2に記載の配列を含むクモ糸タンパク質が用いられる。

【0026】

実質的に同等の機能を有する範囲における、配列番号1または2または3または4に記載の配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加を有するものも含まれる。すなわち、タンパク質は、種々の方法により改変されても、その基本的な特徴を保持することが十分に認識されている。このことは、基本となるポリペプチド配列に比較して、1または数個のアミノ酸の欠失、置換または付加といった変異が存在するが、基本となる無変位配列と同等の機能すなわち所望の性質を保持していることを意味する。

【0027】

また遺伝子組換えカイコを用いて効率的にクモ糸タンパク質を作らせるためには、カイコ絹糸腺で発現する遺伝子のコドン利用頻度に近い遺伝子であることが望ましい。カイコ絹糸腺で発現する遺伝子の例としては、フィブロインH鎖遺伝子、フィブロインL鎖遺伝子、P25タンパク質遺伝子などが挙げられる。カイコ絹糸腺で発現する遺伝子のコドン利用頻度に近づくよう改変、変異させることができ、その手段は公知である。具体的にはタンパク質を作る遺伝子を改変する手法が用いられる。例えば、ランダム変異導入法、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独または適宜組み合わせで行うことができる。例えば亜硫酸水素ナトリウムを用いた化学的な処理によりシトシン塩基をウラシル塩基に置換する方法や、マンガンを含む反応液中でPCRを行い、DNA合成時のヌクレオチドの取り込みの正確性を低くする方法、部位特異的変異導入のための市販されている各種キットを用いることもできる。例えばSambrook等編[Molecular Cloning-A Laboratory Manual、第2版] Cold Spring Harbor Laboratory, 1989、村松正實編[ラボマニュアル遺伝子工学] 丸善株式会社、1988、エーデルリッヒ、H.E. 編[PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用] ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができる。

【0028】

本発明において、クモ糸タンパク質は、絹糸構成タンパク質であるフィブロインH鎖に

含まれるポリペプチドと融合していることが望ましい。好ましくは、クモ糸タンパク質はフィブロインH鎖のC末端部分と融合している。特に好ましくは、クモ糸タンパク質はフィブロインH鎖のN末端部分とフィブロインH鎖のC末端部分の間に挿入されている。この様に構成されたクモ糸タンパク質を含む融合タンパク質は、フィブロインH鎖タンパク質のC末端部分に含まれるシステインを介して、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成する。

【0029】

本発明において用いられるクモ糸タンパク質の分子量に関しては特に制限はない。クモ糸の持つ所望の性質を付与するためには分子量は高いことが望ましいが、同時にクモ糸タンパク質を作る遺伝子の取り扱いを困難にする。したがってクモ糸タンパク質は、好ましくは分子量30～300kDaの範囲、さらに好ましくは30～160kDaの範囲であることが望ましい。

【0030】

本発明の絹糸は、クモ糸の持つ優れた性質によって改良された性質を持つ。より具体的には遺伝子を組換えていない同種カイコの作る絹糸と比較して高い引張強度や高伸度、高弾性率や伸縮性に優れる点、耐屈曲性、大きなエネルギー対ブレーク限界すなわち高いタフネス性、粘着性、含水時の収縮性、耐候性や耐光性に優れる点などから選ばれる少なくとも一つの特徴を示すが、それら全てを満たすことを意味するものではない。好ましくは高い引っ張り強度や高伸度、高いタフネス性の中から選ばれる少なくとも一つの性質を示す。

【0031】

本発明において、クモ糸タンパク質を含む絹糸をカイコに産生させるために用いるプロモーターは特に限定されないが、転写活性の高いものが好ましい。例えば、特開平6-261770や特開昭62-285787に記載されているショウジョウバエの熱ショックタンパク質遺伝子のプロモーターやカイコアクチン遺伝子のプロモーター (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000) などが挙げられるが、フィブロインH鎖遺伝子のプロモーター (GenBank登録番号V00094の塩基番号255～574番目、GenBank登録番号AF226688の塩基番号62118～62437番目)、フィブロインL鎖遺伝子のプロモーター (Gene, 100:151-158: GenBank登録番号M76430)、セリシン遺伝子のプロモーター (GenBank登録番号AB007831の塩基番号599～1656番目) などカイコ絹糸腺細胞中で高い転写促進活性を有するプロモーターが好適である。また、フィブロインH鎖遺伝子プロモーターおよびその上流領域 (GenBank登録番号AF226688の塩基番号57444～62437番目) を用いることで高い転写促進がみられる。

【0032】

フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分は、プロモーターによる外来タンパク質の発現を増強する作用を有するDNA配列である。このDNA配列は、フィブロインH鎖遺伝子の第1エクソンと第1イントロン全長またはその一部および第2エクソンの一部を含む。また、フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分は配列番号4記載のフィブロインH鎖タンパク質N末端部分のポリペプチドをコードする。

【0033】

カイコの形質転換のためには、昆虫細胞を遺伝子組換えすることのできる昆虫用のベクターであれば特段の制限なく使用することができる。例えば、カイコ核多角体ウイルス (BmNPV) ベクターや、昆虫由来DNA型トランスポゾンを組み込んだプラスミドベクター等であるが、特に後者が好ましい。昆虫由来DNA型トランスポゾンとしては、piggyBac、mariner (Insect Mol. Biol. 9, 145-155, 2000)、およびMinos (Insect Mol. Biol. 9, 277-281, 2000) 等が知られているが、本発明においてはpiggyBacが好ましい。

【0034】

PiggyBacトランスポゾンとは、両端に13塩基対の逆位配列と、内部に約2.1k塩基対のORFを有するDNAの転位因子である。本発明において使用されるpiggyBacトランスポゾンは特に限定されないが、例えばTrichoplusia in cell line TN-368、Autographa

californica NPV(AcNPV)、Galleria mellonea NPV(GmMNPV)由来のものを用いることができる。好ましくはTrichoplusia in cell line TN-368由来PiggyBacの一部を持つプラスミドpHA3PIGとpPIGA3GFP(Nature biotechnology 18, 81-84, 2000)を、トランスポゼースタンパク質を産生するヘルパープラスミドとして用いることができる。

【0035】

ヘルパープラスミドによって産生されるこれらのトランスポゾン、カイコ細胞内で転移活性を示すことから、これらのDNA型トランスポゾンをもとに作製した遺伝子導入用ベクターによりカイコを形質転換させることが可能である。特にpiggyBacをもとに作製した遺伝子導入用プラスミドベクターは、カイコ卵に微量注入することにより、実際にカイコを形質転換させることに成功している(Nat. Biotechnol. 18, 81-84, 2000)。

【0036】

例えばpiggyBacの性質を利用して、以下の方法により遺伝子組換えカイコを作出することができる。まず、カイコ・ゲノム配列内にクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を挿入する。このためには、田村らの方法(Nat. Biotechnol. 18, 81-84, 2000)と同様な方法によって行うことができる。即ち、piggyBacの一对の逆向き反復配列を適当なプラスミドベクターに組み込み、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を一对の逆向き反復配列で挟むように挿入する。そしてこの遺伝子導入用プラスミドベクターを、piggyBacのトランスポゼース発現ベクター(ヘルパープラスミド)と共にカイコ卵へ微量注入する。このヘルパープラスミドは、piggyBacの逆向き反復配列の片方または両方を欠いた、実質的にはpiggyBacのトランスポゼース遺伝子領域のみが組み込まれている組換えプラスミドベクターである。このヘルパープラスミドにおいて、トランスポゼースを発現させるためのプロモーターは、内在性のトランスポゼースプロモーターをそのまま利用しても良いし、あるいは、カイコ・アクチンプロモーターやショウジョウバエHSP70プロモーター等を利用してもよい。次世代カイコのスクリーニングを容易にするために、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を付加したクモ糸タンパク質発現ベクター内に同時にマーカー遺伝子を組み込んでおくこともできる。この場合、マーカー遺伝子の上流に例えばカイコ・アクチンプロモーターやショウジョウバエHSP70プロモーター等のプロモーター配列を組み込み、その作用によりマーカー遺伝子が発現させるようにする。

【0037】

クモ糸タンパク質発現ベクターを微量注入したカイコ卵から、孵化した幼虫(G0世代)を飼育する。このG0世代のカイコのうち一部カイコには、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれている。しかし、この世代のカイコでは、カイコ体内の全細胞のうち一部分の細胞にのみクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれており、全細胞にクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれたカイコを得るためには、G0カイコを交配し、生殖細胞を通じて、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が伝達された遺伝子組換えカイコを得なければならない。即ち、得られた全G0世代のカイコを非組換えカイコと、あるいはG0カイコ同士で交配し、次世代(G1世代)のカイコからクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を有した遺伝子組換えカイコを選抜する必要がある。G1世代のカイコからの遺伝子組換えカイコを選抜は、例えばPCR法やサザンブロット法を用いて行う。また、マーカー遺伝子を組み込んだ場合には、その表現形質を利用して選抜することも可能である。例えばマーカー遺伝子としてGFP等の蛍光タンパク質遺伝子を利用した場合には、G1世代のカイコ卵や幼虫に励起光を照射し、蛍光タンパク質の発する蛍光を検出することにより行うことができる。

【0038】

このようにして選抜されたカイコは、その染色体内にクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれている遺伝子組換えカイコである。加えて、こうして得られた遺伝子組換えカイコは、WO 02/40528A1(特許文献3)に記載され

た相同組換えによって得られた遺伝子組換えカイコと異なり、正常なカイコフィブロインH鎖遺伝子が残されたままであり、つまり、一对のフィブロインH鎖遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコである。

【0039】

本発明において、絹糸に含まれるクモ糸タンパク質の含量は特に制限されるものではなく、重量比で0.1~30%の範囲であればよい。このとき、カイコの吐糸行動による繊維化を妨げない範囲であることが望ましい。しかし30%以上の含量であることにより、強度が低下してしまう可能性がある。そこで強度および/または伸度を保ち、かつクモ糸の持つ所望の性質を付与するためには、より好ましくは0.1~25%、より好ましくは1~15%、さらに好ましくは1~10%の範囲で含まれることが望ましい。

【0040】

クモ糸タンパク質を重量比0.1~25%の範囲内で含む絹糸は、たとえば、フィブロインH鎖上流プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン領域・第二エキソン領域の一部(GeneBank登録番号AF226688の塩基番号57444~63513番目)の下流、またはフィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域(GeneBank登録番号AF226688の塩基番号62118~63513番目)の下流に、配列番号1で示されるペプチドを複数回繰り返したペプチド配列をコードした塩基を連結し、さらにその下流にフィブロインH鎖C末端領域遺伝子・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域(GeneBank登録番号AF226688の塩基番号79099~79995番目)を、フレームが合うように連結した遺伝子構造を、XhoI処理後平滑化したpigA3GFPプラスミドに連結する。この遺伝子導入用ベクターおよびpiggyBacトランスポゼースタンパク質を生産するDNAを含むヘルパープラスミド(pHA3PIG)を各200 μ g/ml含んだ0.5mMリシン酸バッファー(pH7.0)・5mMKCl溶液を調製し、3~20nlを産卵後4時間以内のカイコ卵に対してマイクロインジェクションし、遺伝子組換えカイコを作る。このように作成した組換えカイコは、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生する。

【0041】

このとき、遺伝子の導入された染色体上の位置の違いにより、含まれるクモ糸タンパク質の含量には差異が生じる。

【0042】

さらに、導入するクモ糸タンパク質のペプチド配列の繰り返しの回数に特に制限はないが、好ましくは3~30回、さらに好ましくは4~16回である。

【0043】

クモ糸タンパク質の含量は、繭を可溶化後、SDS-PAGEに付し、銀染色キット(第一化学薬品株式会社製)を用い、添付のプロトコールに従ってクモ糸タンパク質の検出を行い、その結果をモレキュラーイメージャー(BioRad社製)を用いてシグナル強度を測定し、濃度既知のタンパク質例えばネコインターフェロンのシグナル強度と比較することでタンパク質含量を測定することができる。

【0044】

本発明において使用されるDNAを取得する方法に特に制限はない。既知の遺伝子情報に基づき、PCR法を用いて必要な遺伝子領域を増幅取得する方法、既知の遺伝子情報に基づきゲノムライブラリーやcDNAライブラリーより相同性を指標としてスクリーニングする方法などが挙げられる。本発明においては、これらの遺伝子は遺伝的多型性や変異剤などを用いた人為的変異処理による変異型も含む。遺伝的多型性とは遺伝子上の自然突然変異により遺伝子の塩基配列が一部変化しているものをいう。

【0045】

クモ糸タンパク質を絹糸腺細胞の外に大量に分泌させる場合、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分をクモ糸タンパク質と融合させることにより、絹糸中にクモ糸タンパク質を産生することが可能となる。また、フィブロインH鎖遺伝子のC末端部分は、クモ糸タンパク質のN末端側、C末端側、クモ糸タンパク質中のいずれに存在してもよい。この部分に

は、少なくともシステイン残基が一つ存在している。フィブロインH鎖タンパク質においては、フィブロインL鎖とジスルフィド結合で結合する役割を有しているシステイン残基はフィブロインH鎖タンパク質のC末端から20番目に位置することになる。クモ糸タンパク質と融合させるフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分の長さは、フィブロインL鎖とのジスルフィド結合の形成を阻害することがない限り特に制限はない。

【0046】

同じくクモ糸タンパク質を絹糸腺細胞の外に大量に分泌させる場合、フィブロインH鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインL鎖タンパク質と融合させることで、絹糸中にクモ糸タンパク質を産生することも可能である。しかし、高伸度、高強度といった所望の性質をクモ糸タンパク質を含む絹糸に付与するためには、フィブロインH鎖タンパク質のC末端部分を融合させる方が好ましい。

【0047】

本発明における「フィブロインH鎖タンパク質に含まれるポリペプチド」とは、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分のポリペプチドおよび／またはフィブロインH鎖遺伝子の第1エキソンと第2エキソンの一部にコードされるポリペプチドを示す。フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分のポリペプチドとして、好ましくは配列番号3に記載のポリペプチドが用いられる。また、フィブロインH鎖遺伝子の第1エキソンと第2エキソンの一部にコードされるポリペプチドとして、好ましくは配列番号4に記載のポリペプチドが用いられる。このとき、実質的に同等の機能を有する範囲において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加を有するものも用いることができる。

【0048】

ポリA付加領域についても特に制限はないが、フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、セリシンなど絹糸腺で大量に発現しているタンパク質遺伝子のポリA付加領域が好適に使用できる。

【0049】

本発明における遺伝子組換えカイコとは、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子構造を有するカイコを示す。組換え体の選抜を容易にする目的で、抗生物質耐性遺伝子、クラゲ由来蛍光緑色タンパク質遺伝子などマーカー遺伝子を組み込んでおくこともできる。

【0050】

本発明におけるクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) とは、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質を示し、励起光により緑色の蛍光を発することが特徴である。蛍光強度や蛍光波長が改良された類縁体を用いることも可能である。

【0051】

しかし、クモ糸タンパク質のもつ高強度、高伸度といった特徴を発揮するには、こうした選択マーカーとなるタンパク質をコードする遺伝子と、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子とをフレームが一続きとなるように連結し、選択マーカーとなるタンパク質との融合タンパク質として発現させることは好ましくない。結晶性の高い繊維タンパク質としての性質を持つクモ糸タンパク質に、結晶性が低く、非繊維性のGFPを融合させることは、絹糸の結晶化を阻害し、繭の重量低下、絹糸の強度低下を引き起こす可能性があるからである。従って、「クモ糸タンパク質が、選択マーカーとなるタンパク質と融合していない」ことは、WO 02/40528A1 (特許文献3) において開示されている実施例と異なり、強度、伸度および／あるいはタフネスを低下させないために重要な現象である。WO 02/40528A1 (特許文献3) に記載の手法では、GFPなどの選択マーカーとなるタンパク質と融合させることが実質的に必須であるが、本発明においては選択マーカーとなるタンパク質を融合させる必要はない。

【0052】

本発明における「一対のフィブロインH鎖遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコ」とは、内

在性のカイコフィブロインH鎖遺伝子に、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子やGFPなどの蛍光タンパク質遺伝子といった外来遺伝子が挿入されておらず、正常なフィブロインH鎖遺伝子を持っており、かつフィブロインH鎖遺伝子以外の領域に、カイコが本来有していない外来遺伝子が導入されている遺伝子組換えカイコを示す。好ましくは、相同染色体上の同一遺伝子座に存在する一対のフィブロインH鎖遺伝子をもつ遺伝子組換えカイコを示す。

【0053】

一対のフィブロインH鎖遺伝子以外に外来遺伝子が導入されたことを確認するには、まず、遺伝子組換えカイコゲノムから外来遺伝子が挿入された断片を、インバースPCRや、カイコゲノムを種々の制限酵素で処理し外来遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法を用い、常法によるクローニングを行うといった手法により取得する。こうして得られた断片の塩基配列を確認することで、フィブロインH鎖遺伝子 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号57444~79995) 以外に外来遺伝子が導入されたことを確認することができる。

【0054】

カイコの絹糸は主としてフィブロインH鎖タンパク質が繊維化することにより形成される。したがって、一対のフィブロインH鎖遺伝子を有することは、遺伝子組換えカイコを作る絹糸において、強度や伸度といった物性を低下させない上で重要な現象である。

これらのカイコを非組換えカイコまたは遺伝子組換えカイコどうしで交配させた場合、子孫においてもクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子は消失することなく伝達され、世代を通じてクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生させることができる。

【0055】

従って、組換えカイコを継代し頭数を増やすことで、クモ糸タンパク質を含む絹糸の生産量を容易にスケールアップすることが可能である。交配において、商業用蚕品種のカイコと交配させることで、クモ糸タンパク質を含む絹糸の産生量を向上させることも可能である。この場合、目的のクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が導入されたカイコを適宜選抜しながら継代していく必要が生じる。この場合、任意の組織から得られた細胞のDNAを用いて、組換えカイコ選抜に使用したマーカー遺伝子の組織から得られた細胞のDNAを用いて、組換えカイコ選抜に使用したマーカー遺伝子やクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子の存在や構造を、PCR、サザンブロットティング法などで解析することで、容易に組換えカイコの遺伝子を継承した子孫を判別することが可能である。また、GFP等の蛍光タンパク質遺伝子を利用した場合には、カイコ卵や幼虫に励起光を照射し、蛍光タンパク質の発する蛍光を検出することにより選抜を行うことができる。

【0056】

カイコガ (*Bombyx mori*) の卵に含まれる細胞に遺伝子を導入する場合には、マイクロインジェクションする方法が好適である。ここで卵にマイクロインジェクションを行う場合、卵中の細胞に直接マイクロインジェクションする必要はなく、卵中にマイクロインジェクションするだけで遺伝子を導入することが可能である。

【0057】

本発明における「遺伝子を組換えしていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、強度が向上している」とは、クモ糸の持つ所望の性質である高強度性が反映されたことを示す。具体的には絹糸に加重を加え、破断するまでの破断強度が向上したことを示す。

【0058】

強度の測定には引張り試験機 (テンシロン) を用いて測定することができる。破断強度は、破断点までの最大点荷度 (g) / 繊維度 (d) として表される。繊維度の測定は単位長さにおける重量から算出することができる。遺伝子を組換えたカイコが作る繭から得られた絹糸と、遺伝子を組換えしていない同種カイコが作る繭から得られた絹糸との強度を比較することで向上したか否かを判定することができる。好ましくは遺伝子を組換えしていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、強度が1%以上向上していることが望ましい。

より好ましくは強度が10%以上向上し、さらに好ましくは20%以上向上していることが望ましい。

【0059】

本発明における「遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、伸度が向上している」とはクモ糸の持つ所望の性質である高伸度性が反映されたことを示す。具体的には絹糸に加重を加え、破断するまでの破断伸度が向上したことを示す。伸度の測定には引張り試験機（テンシロン）を用いて測定することができる。遺伝子を組換えたカイコが作る繭から得られた絹糸と、遺伝子を組換えていない同種カイコが作る繭から得られた絹糸との破断伸度を比較することで向上したか否かを判定することができる。好ましくは遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、伸度が1%以上向上していることが望ましい。より好ましくは伸度が10%以上向上し、さらに好ましくは伸度が30%以上向上していることが望ましい。

【0060】

強度 \times (伸度)^{1/2}として算出されるタフネスを、遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較した場合、好ましくは遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、タフネスが1%以上向上していることが望ましい。より好ましくはタフネスが10%以上向上し、さらに好ましくはタフネスが40%以上向上していることが望ましい。

【0061】

本発明において「クモ糸タンパク質を含む絹糸を用いた織物」とは、クモ糸タンパク質がたて糸および／または横糸に用いられた織物を表す。クモ糸タンパク質を含む絹糸のみから構成される織物であっても良く、非組換えカイコの絹糸との混紡糸が用いられても良く、絹糸ではない繊維との混紡糸が用いられても良く、加工され表面処理剤として用いられても良く、加工され不織布として用いられても良い。また、編み物であるニットに用いられても良い。織物の作製方法として、特に制限されるものではないが、具体的には平織り、綾織り、朱子織り、からみ織りなどが挙げられる。

【0062】

絹糸中でのクモ糸タンパク質の存在形態としては、分散と局在が予測される。局在とはフィブロイン層において、組換えタンパク質が一部分に集合して存在していることをしめす。局在している場合、酢酸ウラニルと鉛の二重染色による電子顕微鏡観察において、染色性の異なる領域として観察される。もしくは、絹糸をグルタルアルデヒドで固定、エポキシ樹脂で包埋し作成した切片箔に対し、組換えタンパク質に対する抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行うことで、組換えタンパク質由来のシグナルが、フィブロイン層中で偏っていることで判定できる。組換えタンパク質が絹糸中に分散している場合、同じく免疫電子顕微鏡観察でフィブロイン層中での組換えタンパク質由来のシグナルが偏ることなく存在していることを示す。

【0063】

クモ糸タンパク質が絹糸中に分散していることを特徴とする本発明における絹糸は、絹糸を構成するフィブロインタンパク質と、クモ糸タンパク質との複数のタンパク質（ポリマー）からなるアロイである。一般に2種類のポリマーをブレンドしても、両者の性質の違いにより分離し、諸物性が低下する。絹糸において、絹糸を構成するフィブロインタンパク質と、フィブロイン以外の組換えタンパク質を混合して、人工的に繊維化させる場合、両者の結晶性の違いによりフィブロインタンパク質と組換えタンパク質は均一に混合されず、強伸度といった諸物性は低下する。本発明において示した手法により、絹糸を構成するフィブロインタンパク質と、フィブロイン以外の組換えタンパク質を均一に混合させることができ、組換えタンパク質が絹糸中に分散していることを特徴とする組換えタンパク質を含む絹糸を得ることができる。該絹糸はフィブロインのもつ強伸度を低下させることなく、組換えタンパク質の持つ所望の性質を該絹糸に付与することが可能となる。

以下に実施例を示し、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例の記載に限定されるものではない。

【実施例】

【0064】

実施例1 カイコガ (*Bombyx mori*) のゲノムDNAの調製

5 齢 3 日目のカイコを解剖し、後部絹糸腺組織を取り出した。1×SSCで洗浄した後、DNA抽出バッファー(50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 100mM NaCl) 200 μ l を加えた。Proteinase K(final 200 μ g/ml)を加えて組織をグラインダーで充分すりつぶし、更にDNA抽出バッファーを350 μ l、10%SDS 60 μ lを加えて混合した。50℃で2時間保温した。Tris-HCl飽和フェノール(pH8.0) 500 μ lを加え10分混合後、10,000rpm 5分 4℃にて遠心分離し上清を回収した。上清をフェノール/クロロホルム処理し、ゲノムDNAをエタノール沈殿した。RNase入り滅菌水で100 μ g/mlとなるように溶解、希釈しゲノムDNA溶液を調製した。

【0065】

実施例2 遺伝子の調製

用いた遺伝子は既知の配列を利用して、その両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型としてPCRを行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

【0066】

フィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号62118~63513番目: 以下HP領域) は、カイコガのゲノムDNAを鋳型に、プライマー5 (配列番号5) とプライマー6 (配列番号6) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

【0067】

フィブロインH鎖上流プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号57444~62927番目: 以下HUP領域) は、カイコガのゲノムDNAを鋳型に、プライマー7 (配列番号7) とプライマー8 (配列番号8) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

【0068】

フィブロインH鎖C末端領域遺伝子・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号79099~79995番目: 以下HC領域) は、カイコガのゲノムDNAを鋳型に、プライマー9 (配列番号9) とプライマー10 (配列番号10) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

【0069】

PCRはKODplus (東洋紡(株)製) を用いて添付のプロトコールに従って行った。すなわち、カイコガのゲノムDNAを鋳型とする場合にはこれを100ng加え、各プライマーを50pmol、添付の10×PCRバッファーを10 μ l、1mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、2単位KODplusとなるように各試薬を加え、全量100 μ lとする。DNAの変性条件を94℃、15秒、プライマーのアニーリング条件を55℃、30秒、伸長条件を68℃、60~300秒の条件でPerkin-Elmer社のDNAサーマルサイクラーを用い、30サイクル反応させた。

【0070】

これらの反応液を1%アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれHP領域では約1.4kbp、HUP領域では約5.5kbp、HC領域では約0.8kbpのDNA断片を常法に従って抽出、調製した。これらのDNA断片をポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造(株)製) によりリン酸化した後、BamHIで切断後、T4DNAPolymeraseを用い定法により平滑化し、さらに脱リン酸化処理したpUC19ベクターに宝酒造(株)のDNA Ligation Kit Ver.2を用いて16℃、終夜反応を行い、連結した。これらを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体にPCR断片が挿入されていることを、得られたコロニーを前述と同じ条件でPCRすることによって確認し、PCR断片の挿入されたプラスミドを常法によって調製した。これらのプラスミドをシーケンスすることにより、得られた断片がそれぞれの遺伝子の塩基配列であることを確認した。

【0071】

クモ糸遺伝子の取得は、ATCCから以下の株として入手可能である。

大腸菌 (E.coli) FP3227 69326 1993年6月15日、E.coli FP 2193 69327 1993年6月15日、E.coli FP 3350 69328 1993年6月15日。

【0072】

または、Reviews in Molecular Biology 74(2000) 105-109やAppl. Microbiol. Biotechnol. 47(1997) 23-39に開示されている手法により、人工合成したオリゴヌクレオチドを元に作成することが可能である。すなわち人工合成したオリゴヌクレオチドの両端に、BglIIIとBamHIの制限酵素認識部位を、同じフレームになるようデザインし、両者を順次連結することで種々のサイズのクモ糸遺伝子を作製することが可能である。本実施例では配列番号1記載のDP-1B.33ポリペプチドを4回繰り返したDP4、DP-1B.33を8回繰り返したDP8、DP-1B.33を12回繰り返したDP12、DP-1B.33を16回繰り返したDP16遺伝子断片を作製した。

【0073】

同様の手法により、配列番号2に記載のポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを作製し、これを連結することで配列番号2記載のポリペプチドが8回繰り返したタンパク質をコードするプラスミドを構築し、これをBglIIIとBamHIで切断し、AEX遺伝子断片を作製した。

【0074】

実施例3 遺伝子導入用プラスミドの作製

遺伝子導入用プラスミドにはpigA3GFP (Nature Biotechnology 18,81-84,2000) を利用した。すなわち、米国特許第6218185号に開示されるプラスミドp3E1.2よりtransposaseをコードする領域を取り除き、その部分にA3プロモーター (GenBank登録番号U49854の塩基番号1764~2595番目) およびpEGFP-N1ベクター (Clontech社製) 由来のGFPおよびSV40由来ポリA付加配列 (GenBank登録番号U55762の塩基番号659~2578番目) を挿入したベクターがpigA3GFPであり、このベクターは独立行政法人農業生物資源研究所から分与可能である。そのA3プロモーターの上流側にあるXhoI部位を平滑化しクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を挿入した。

【0075】

本実施例における、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子の構成は、HP・DP16, 12, 8, 4・HCおよびHP・AEX・HC、さらにはHUP・DP8, 4・HCである。

以下に具体的な方法を示す。

【0076】

図1には、HP・DP16, 12, 8, 4・HCおよびHP・AEX・HCの作製ストラテジーを示した。実施例2にて調製したHP領域を持つプラスミドとHC領域を持つプラスミドをBamHIとSalIで処理し、それぞれ約1.4 kbp断片と3.6 kbp断片を連結した。これをBamHIで処理後、脱リン酸化したプラスミドと、実施例2で取得した両端がBglIIIおよびBamHI付着末端を持つDP16断片、DP12断片、DP8断片、DP4断片およびAEX断片を連結した。連結部の塩基配列を確認し、連結部が同一フレームでの読み枠であること、順向きであることを確認した。各プラスミドをAscIで処理し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片を、XhoI処理後平滑化したpigA3GFPプラスミドに連結し、各種遺伝子構造HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HCをもった各種遺伝子導入ベクターを作製した。

【0077】

図2にはHUP・DP8, 4・HCの作製ストラテジーを示した。実施例2にて調製したHUP領域を持つプラスミドをSphIとXhoIで処理し、約5.5 kbp断片を得た。これを、図2に示したように、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC作製の過程で得られたプラスミドをSphIとXhoIで処理し得られた断片と連結した。連結部の塩基配列を確認し、塩基の欠失、挿入が起きていないことを確認した。各プラスミドをAscIで処理し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子

を含むDNA断片を、XhoI処理後平滑化したpigA3GFPプラスミドに連結し、各種遺伝子構造HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HCを持った各種遺伝子導入ベクターを作製した。

【0078】

実施例4 遺伝子組換えカイコの作製

実施例3に記載の遺伝子導入用ベクターとpiggyBacトランスポゼースタンパク質を生産するヘルパープラスミドDNA (pHA3PIG) (Nature biotechnology 18, 81-84, 2000 農業生物資源研究所より分与可能) を、各200 μ g/ml含んだ0.5mMリン酸バッファー (pH7.0)・5mMKCl溶液に調製し、3~20nlを産卵後4時間以内のカイコ卵500個に対してマイクロインジェクションした。pHA3PIGは、piggyBacトランスポゾンの方の逆位反復配列と5' フランキング領域、トランスポゼース遺伝子のリーダー配列を欠いており、その代わりにカイコアクチン遺伝子の5' フランキング領域とリーダー配列が組み込まれている。pHA3PIGはアクチンプロモーターの働きによりpiggyBacトランスポゼースタンパク質を作る機能を持つが、piggyBacトランスポゾンの方の逆位反復配列が欠損しているため自身のDNAは転移しない。そのカイコ卵より孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫 (G0) を群内で掛け合わせ得られた次世代 (G1) をクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光を観察することにより、クラゲ緑色蛍光タンパク質遺伝子が染色体へ導入されたカイコをスクリーニングした。その結果、クラゲ緑色蛍光タンパク質の働きにより蛍光を発する遺伝子組換えカイコが得られた。遺伝子組換え体の選抜は、内部交配により得られたG1幼虫でのGFPの蛍光を指標にスクリーニングした。後部絹糸腺組織におけるアクチンプロモーター制御化での遺伝子発現はきわめて低く、また、絹糸腺組織から絹糸中に分泌される上で重要なフィブロインL鎖タンパク質との結合を形成することはない。つまり、本発明においては、クモ糸タンパク質を含む絹糸には、GFPは含まれず、本発明において、遺伝子組換えカイコの選抜には、繭および絹糸でのGFPによる蛍光を指標として用いない。遺伝子組換えカイコの作製結果を表1に示す。

【0079】

【表1】

表1 遺伝子組換えカイコの作製結果

遺伝子構造	インジェクション卵数	孵化卵数	総G1数	GFP ポジティブ G1 数	形質転換 効率%
HP・DP16・HC	500	80	32	3	4.7
HP・DP12・HC	1056	169	51	8	7.8
HP・DP8・HC	500	202	93	14	7.1
HP・DP4・HC	500	171	81	13	8.2
HP・AEX・HC	500	211	96	15	7.8
HUP・DP8・HC	1824	544	170	4	1.2
HUP・DP4・HC	1152	414	139	7	2.5

【0080】

実施例5 サザンハイブリダイゼーションによるクモ糸タンパク質遺伝子導入の確認

HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC遺伝子を導入したG1カイコのうち、GFPの蛍光を示すカイコをランダムに選抜し、実施例1に記載の方法でゲノムDNAを調製し、EcoRIで制限酵素処理を行い、電気泳動後メンブレンにプロットした。プローブはアマシャムファルマシア社製Gene-ImageTM Random prime labelling and detection moduleをもちいて、DP8/BglII、BamHI断片をラベリングし用いた。添付のプロトコルに従いクモ糸タンパク質をコードする遺伝子の検出を行った。その結果を図3に示す。調べた全てのGFP蛍光を示すカイコにおいて、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子が検出された (矢印で示す)。また、シグナルのサイズが異なることから、染色体上にランダムに挿入されたと考えられる。

【0081】

実施例6 遺伝子組換えカイコの作製する繭の解析

次に絹糸に含まれるクモ糸タンパク質の検出、含量の測定を行った。遺伝子を組換えしていないカイコおよび遺伝子組換えカイコ (HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC遺伝子を導入したカイコ) の繭を各10mg量り採り、60% LiSCN 44mlを加え攪拌後、終夜室温に静置し繭を溶解した。これを8M尿素・2% SDS・5% 2-メルカプトエタノールで10倍希釈したものをサンプルとし、SDS-PAGEに付した後、銀染色キット (第一化学薬品株式会社製) を用い、添付のプロトコールに従ってクモ糸タンパク質の検出を行った。その結果をモレキュラーイメージャー (BioRad社製) を用いてシグナル強度を測定し、濃度既知のタンパク質としてはネコインターフェロンを用いてそのシグナル強度と比較しタンパク質含量を測定した。シグナルの比較には、BioRad社製モレキュラーイメージャーFXProを用いた。

【0082】

さらに、ECL PlusTM Western blotting Kit (アマシャムファルマシア社製) を用い、添付のプロトコールに従ってクモ糸タンパク質の検出を行った。DPの検出には配列番号11に示したCGAGQGGYGGLGSQAGRGペプチドに対する十分な抗体価を有する特異的なペプチド抗体を、AEXの検出には配列番号12に示したCGPGQQGPGGYGPGQQGPSペプチドに対する十分な抗体価を有する特異的なペプチド抗体を、共にラビットを用いて作製し、これらの抗体を用いて添付のプロトコールに従って検出した。すなわち、プロッティングしたメンブレンをブロッキング溶液 (5%スキムミルク・0.1%Tween20・PBS) 中で4℃終夜ブロッキングした。メンブレンをTPBS (0.1%Tween20・PBS) で2回洗浄し、TPBSで1000倍希釈した抗クモ糸タンパク質抗体で室温1時間処理した。メンブレンをTPBSで2回洗浄し、更にTPBSで5分間3回洗浄した。その後TPBSで10000倍希釈した後、HRPラベル抗ラビットIgG抗体で室温1時間処理した。メンブレンをTPBSで2回洗浄し、更にTPBSで5分間3回洗浄した後、ECL PlusTM Western blotting Detection System (アマシャムファルマシア社製) の検出試薬 (溶液A+溶液B) を加えた。発光をHyperfilmTMECLTM

に露光、現像した。HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC遺伝子構造を導入したカイコの作る繭を分析した結果を図4に示す。クモ糸タンパク質の分子量は、遺伝子構造から予測される分子量と一致していた。また、クモ糸タンパク質の占める割合は、重量比で約0.1~15%であった。さらに、フィブロインL鎖タンパク質の分子量相当のサイズが増加した、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合した状態のシグナル (星印で示す) が検出された。HUP遺伝子構造を持つもの (HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC) は、HP遺伝子構造を持つもの (HP・DP8・HC、HP・DP4・HC) と比較して、クモ糸タンパク質の含量が増大していた。絹糸にGF Pが含まれているかを、GF Pに対する抗体 (コスモバイオ社製) をもちいたウエスタン解析により判定したが、GF Pは検出されなかった。

【0083】

HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC遺伝子構造を導入したカイコの作る繭 (繭糸+蛹) の平均重量を雄10粒雌10粒用い測定、比較した。さらに、クモ糸タンパク質の含量 (重量%) を測定した。これらの結果を表2に示す。HP・AEX・HCを除き、繭重量に大きな変化は見られなかった。これはDPクモ糸タンパク質がカイコフィブロインの繊維化を阻害しなかったことを示す。これは、遺伝子の導入を、相同組換えではなくトランスポゾンにより行うことで、カイコフィブロインH鎖遺伝子に変異が起きなかった結果であると考えられる。

【0084】

【表 2】

表 2

遺伝子構造	平均重量 mg	クモ糸タンパク質含量%
非組換え	100	0
HP・DP16・HC	94	0.5
HP・DP12・HC	104	2
HP・DP8・HC	104	0.5~5
HP・DP4・HC	102	1~3
HUP・DP8・HC	77	4~18
HUP・DP4・HC	85	5~15
HP・AEX・HC	34	0.5~1

【0085】

実施例 7 絹糸の調製

コントロールとして非遺伝子組換えカイコの作る繭、サンプルとしてHP・DP8・HC遺伝子構造を導入したカイコの作る繭を、重量が40%になるまで80℃にて乾燥させた。3%Na₂CO₃溶液中で95℃で2分、次いで60℃で3分、次いで95℃で3分煮繭した。40℃の温水で洗浄した後、座繰り操糸器（斉藤機料）を用い、常時40粒の繭から操糸した。非組換えカイコの絹糸は約1100m、組換えカイコ（HP・DP8・HC）の絹糸は約1200m得られた。

【0086】

得られた絹糸を、0.1%Na₂CO₃溶液中で60℃に加温し、次いで1%マルセル石鹼水溶液中で1時間煮沸し、0.1%Na₂CO₃溶液で洗浄後、水洗して絹糸の精練を行った。60℃にて乾燥し、精練された非組換え絹糸と精練されたHP・DP8・HC絹糸を得た。精練前の絹糸と、精練後の絹糸の走査電子顕微鏡写真を図5（1500倍）に示した。表面のセリシン除去が認められる。また、精練前後の重量を比較した結果、非組換え絹糸とHP・DP8・HC絹糸共に、減練率が16%であり、セリシンは除去されたと考えられる。

【0087】

実施例 8 絹糸の物性の測定

物性の測定に、クモ糸タンパク質を含む絹糸として、実施例7に記載の手法により調製したHP・DP8・HC遺伝子構造を導入したカイコの作る絹糸（HP・DP8・HC）と、非組換えカイコの絹糸を用い、それぞれの精練前、および精練後において、物性を測定した。ここで、絹糸中に含まれるクモ糸タンパク質の含量は、HP・DP8・HCでは5%、非組換え絹糸では0%である。

【0088】

織度の測定は90mあたりの重量をもとに算出した。機械物性の測定は引張試験機（テンシロン）をもちい、つかみ間隔20cm、引っ張り速度20cm/分、各10検体の平均から算出した。物性の比較を表3に示す。

【0089】

【表 3】

表 3

	非組換え 絹糸 (精練前)	HP・DP8・HC 絹糸 (精練前)	非組換え 絹糸 (精練後)	HP・DP8・HC 絹糸 (精練後)
繊度 (d)	57.7	87.7	43	56
強度 (g/d)	3.78	3.93	2.59	3.53
伸度 (%)	32.6	37.8	13.2	19.1
タフネス※	21.5	24.1	9.4	15.4

※タフネスは強度×(伸度)^{1/2}として算出

【0090】

全ての試験項目において、HP・DP8・HC絹糸は非組換え絹糸と比較して物性が向上していた。特に精練のための加温処理を経ても、強度は30%以上、伸度は40%以上、タフネスは60%以上向上していた。これは精練後も残るフィブロイン層に含まれるクモ糸タンパク質の効果によると考えられる。

【0091】

実施例9 クモ糸タンパク質を含む絹糸を用いた織物の作製

HP・DP8・HC絹糸を用いて布を調製した。HP・DP8・HC絹糸2本を200T/mでかたよりにし、綾織りにて織物を作製した。

【0092】

実施例10 免疫電子顕微鏡観察

HP・DP8・HC遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコと、非組換えカイコのつくる繭をサンプルとし、オリゴペプチドCGAGQGQGYGLGSQAGRGに対する十分な抗体価を有する特異的なペプチド抗体(DP抗体)を用いて、免疫電子顕微鏡観察を行った。サンプルを2%グルタルアルデヒド0.1%カコジル酸緩衝液を用いて室温にて1時間固定し、次にエポキシ樹脂EPON812を用いて60℃48時間重合させ包埋した。ウルトラミクロトームにより超薄切片を調製した。1%BSA/PBS+1.5%ヤギ血清を用い、室温にて30分ブロッキングした。一次抗体として5000倍希釈したDP抗体を用いて4℃一晚抗体処理した。1%BSA/PBSにて室温10分3回洗浄した。2次抗体としてanti-rabbit IgG Goat-Poly 10nm (British biocell international, LTD製)を用いて室温にて1時間処理した。1%BSA/PBSにて室温10分3回洗浄した。酢酸ウラニルと鉛の二重染色を室温で各5分行い、電子顕微鏡観察を行った。非組換えカイコのつくる絹糸の縦断面切片を用いた結果を図6に示す。絹糸中のフィブロイン層およびセリシン層に、クモ糸タンパク質の存在は確認できない。そして、HP・DP8・HC遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコのつくる絹糸の縦断面切片を用いた結果を図7に示す。HP・DP8・HC遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコのつくる絹糸の縦断面切片を用いた場合において、絹糸中のフィブロイン層に、黒色のドットとしてクモ糸タンパク質が分散して存在していることが確認される。一部に偏って存在している様子は観察されない。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HCおよびHP・AEX・HC遺伝子構造の作製手法を示す図である。

【図2】HUP・DP8・HCおよびHUP・DP4・HC遺伝子構造の作製手法を示す図である。

【図3】HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HUP・DP8・HCおよびHUP・DP4・HC遺伝子構造をもつ遺伝子組換えカイコのゲノムをEcoRIで制限酵素処理したものに対し、クモ糸タンパク質遺伝子DPを標識して行ったサザンハイブリダイゼーションの結果を示した図である。

【図4】HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、H

UP・DP8・HC、HUP・DP4・HC遺伝子構造を導入したカイコの作る繭を、可溶化し、銀染色および抗体を用いたウエスタン解析により分析した結果を示した図である。

【図5】非組換えカイコの作る絹糸と、HP・DP8・HC遺伝子を導入した組換えカイコの作る絹糸の精練前および精練後の状態を走査電子顕微鏡（1500倍）により撮影した結果を示す図である。

【図6】非組換えカイコの作る絹糸をサンプルとし、繊維軸方向に切片を切り、クモ糸タンパク質DPに対する抗体を用いて行った免疫電子顕微鏡観察写真の結果を示す図である（倍率15000倍）。

【図7】HP・DP8・HC遺伝子を導入した組換えカイコの作る絹糸をサンプルとし、繊維軸方向に切片を切り、クモ糸タンパク質DPに対する抗体を用いて行った免疫電子顕微鏡観察写真の結果を示す図である（倍率15000倍）。

【符号の説明】

【0094】

- 1: セリシン層
- 2: フィブロイン層
- 3: クモ糸タンパク質

【配列表】

<110> Toray Industries, Inc.

<110> E. I. Du Pont De Nemours and Company

<120> クモ糸タンパク質を含む絹糸および該絹糸を産生するカイコ

<130> NP-1402

<160> 12

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly
1           5           10           15
Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala
20           25           30
Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala
35           40           45
Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln
50           55           60
Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln
65           70           75           80
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly
85           90           95
Tyr Gly Gly Leu Gly
100 101

```

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

```

Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala
1           5           10           15
Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly
20           25           30
Gly Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Tyr Gly
35           40           45
Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly
50           55           60
Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly
65           70           75           80
Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly
85           90           95 96

```

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Bombyx mori

<400> 3

Arg Ser Tyr Asp Tyr Ser Arg Arg Asn Val Arg Lys Asn Cys Gly Ile
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Gln Leu Val Val Lys Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Asn
 20 25 30

Cys
 33

<210> 4
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Bombyx mori
 <400> 4

Met Arg Val Lys Thr Phe Val Ile Leu Cys Cys Ala Leu Gln Tyr Val
 1 5 10 15
 Ala Tyr Thr Asn Ala Asn Ile Asn Asp Phe Asp Glu Asp Tyr Phe Gly
 20 25 30

Ser Asp Val
 35

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5

aatggcgcgc cgggagaaag catgaag 27

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 6
 catggatccg acatcactcc caaaatagtc 30

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7
 cccaatttgg cgcgcctcaa gacatccttg a 31

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 8
 gaatgctacc tcgaggttat gaaaatg 27

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gctggatccc gcagttacga ctattctcgt cgt

33

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

cttggcgcgc cacgacgtag acgtatagcc atcgg

35

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 11

Cys Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Ala Gly

1

5

10

15

Arg Gly

18

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 12

Cys Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln

1

5

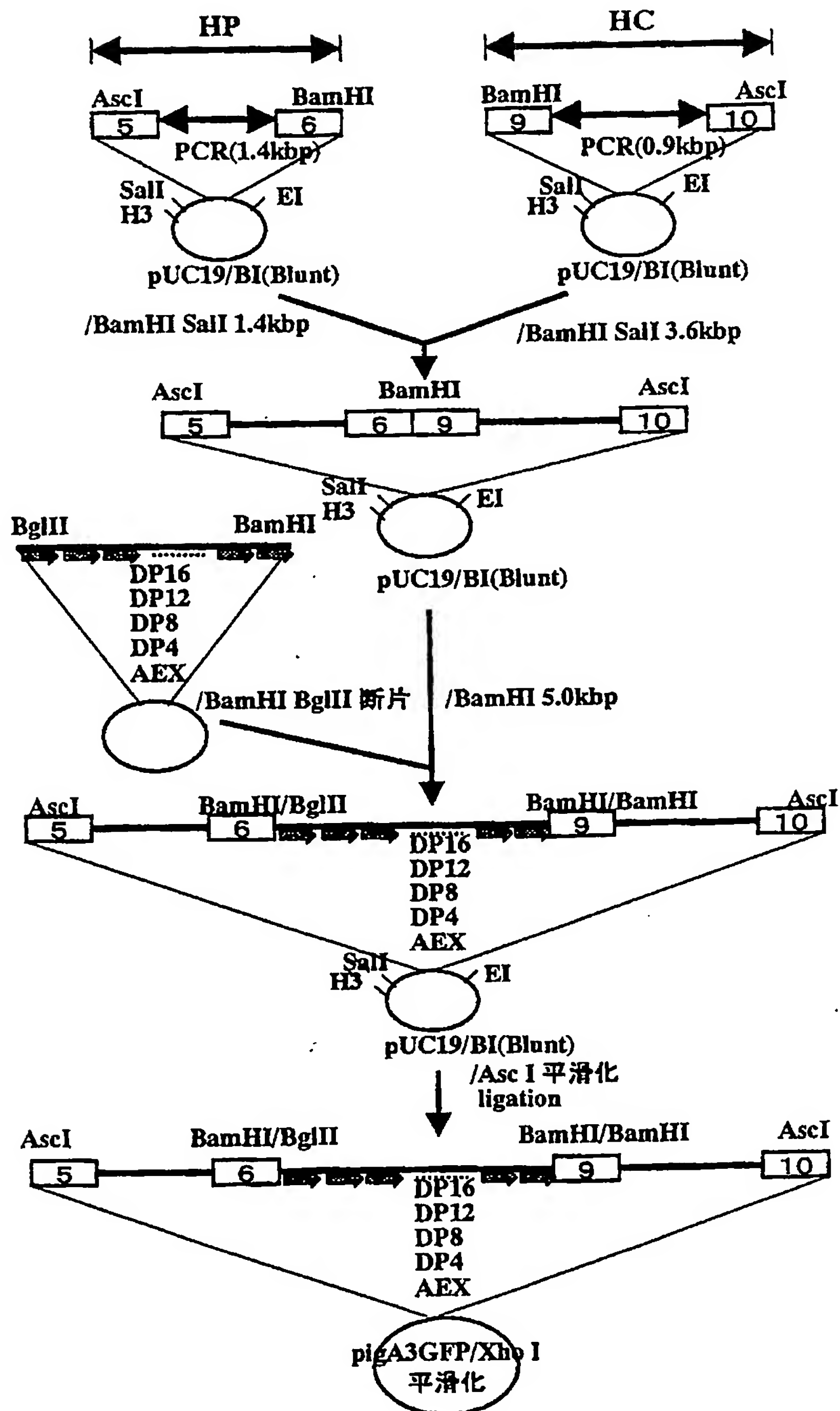
10

15

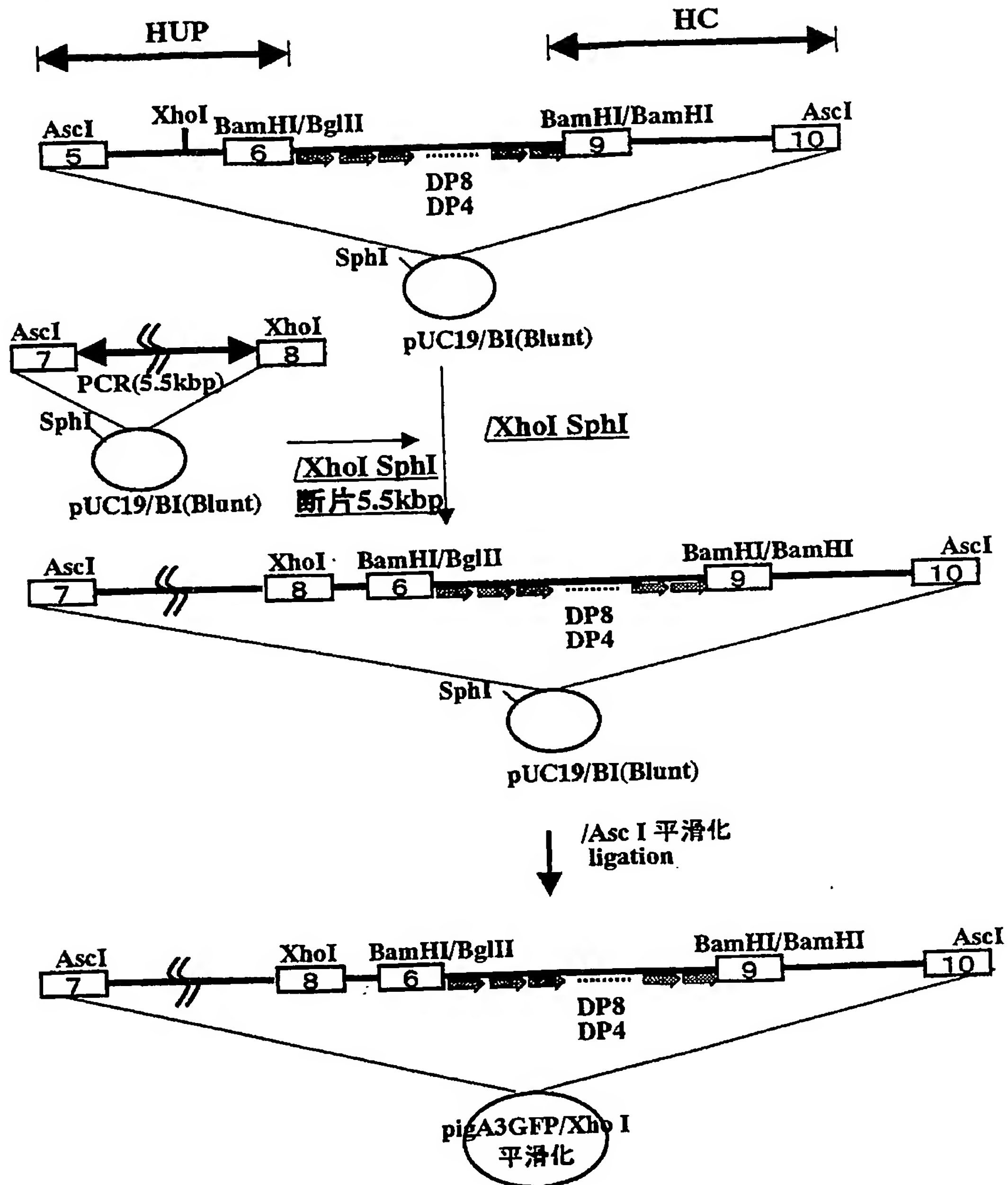
Gly Pro Ser

19

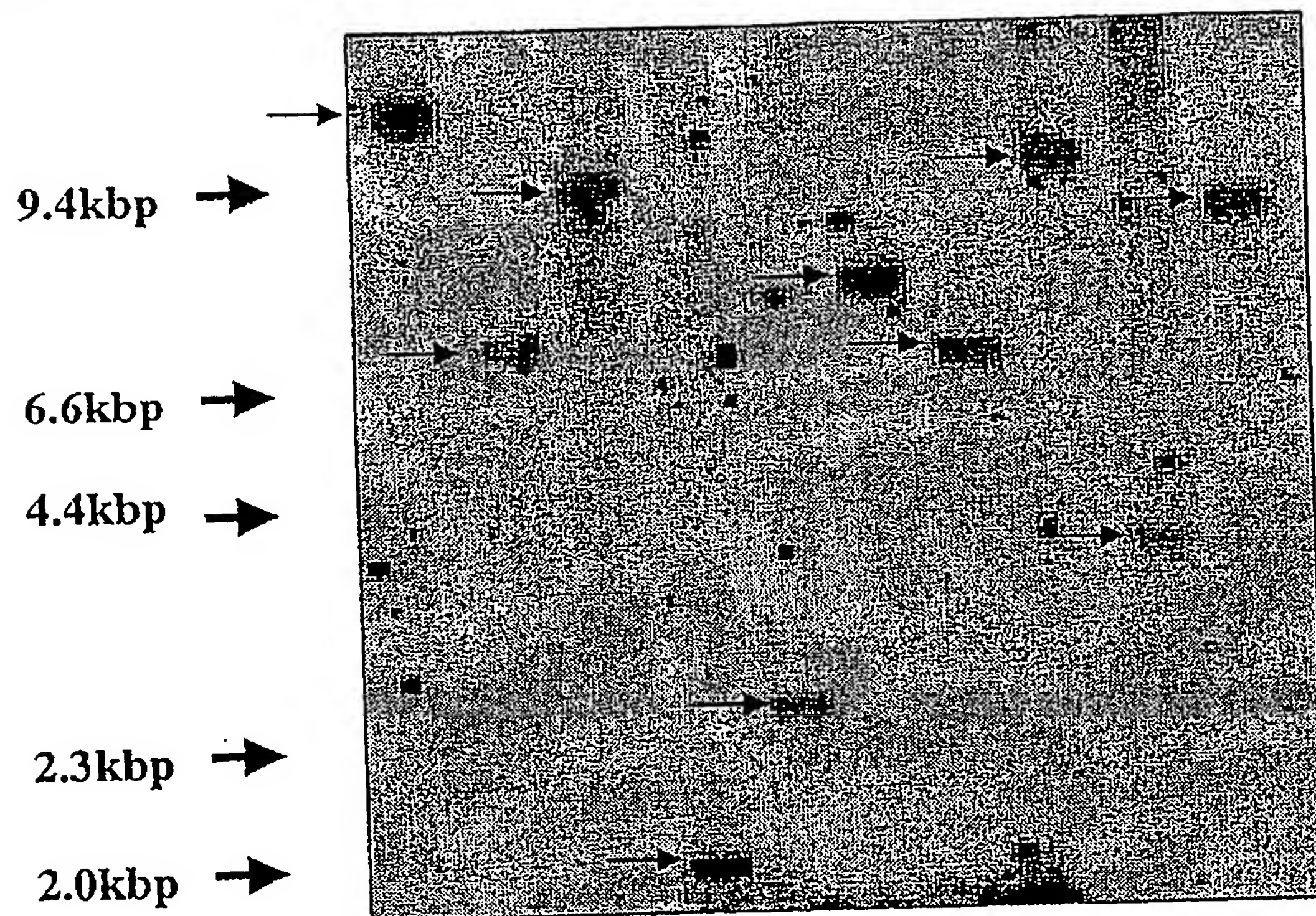
【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】

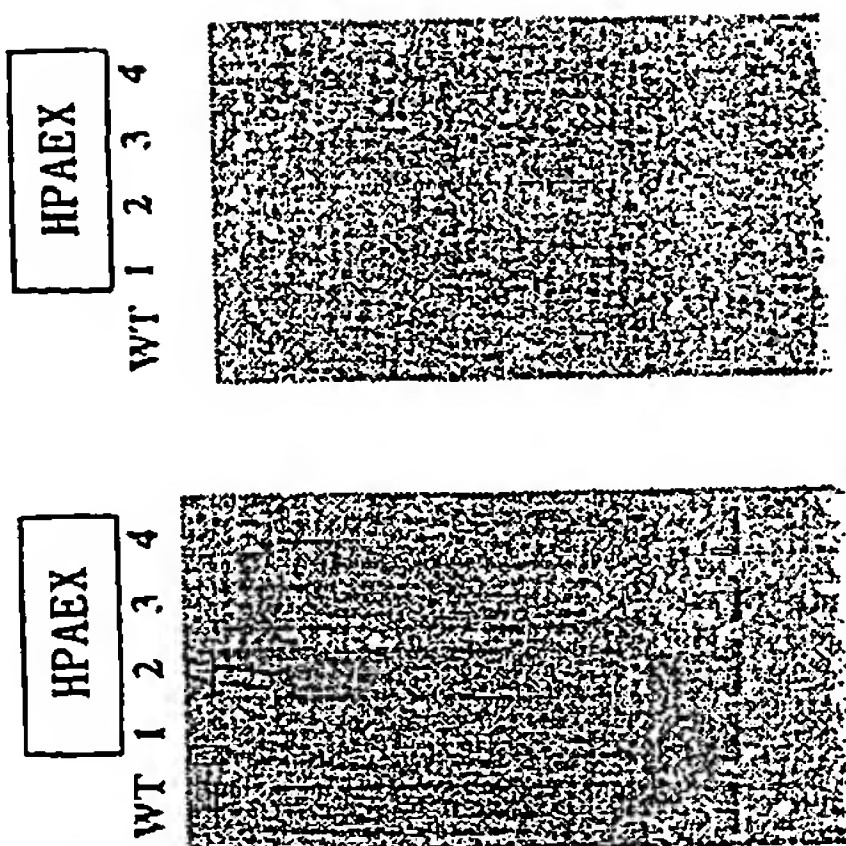


【図 3】



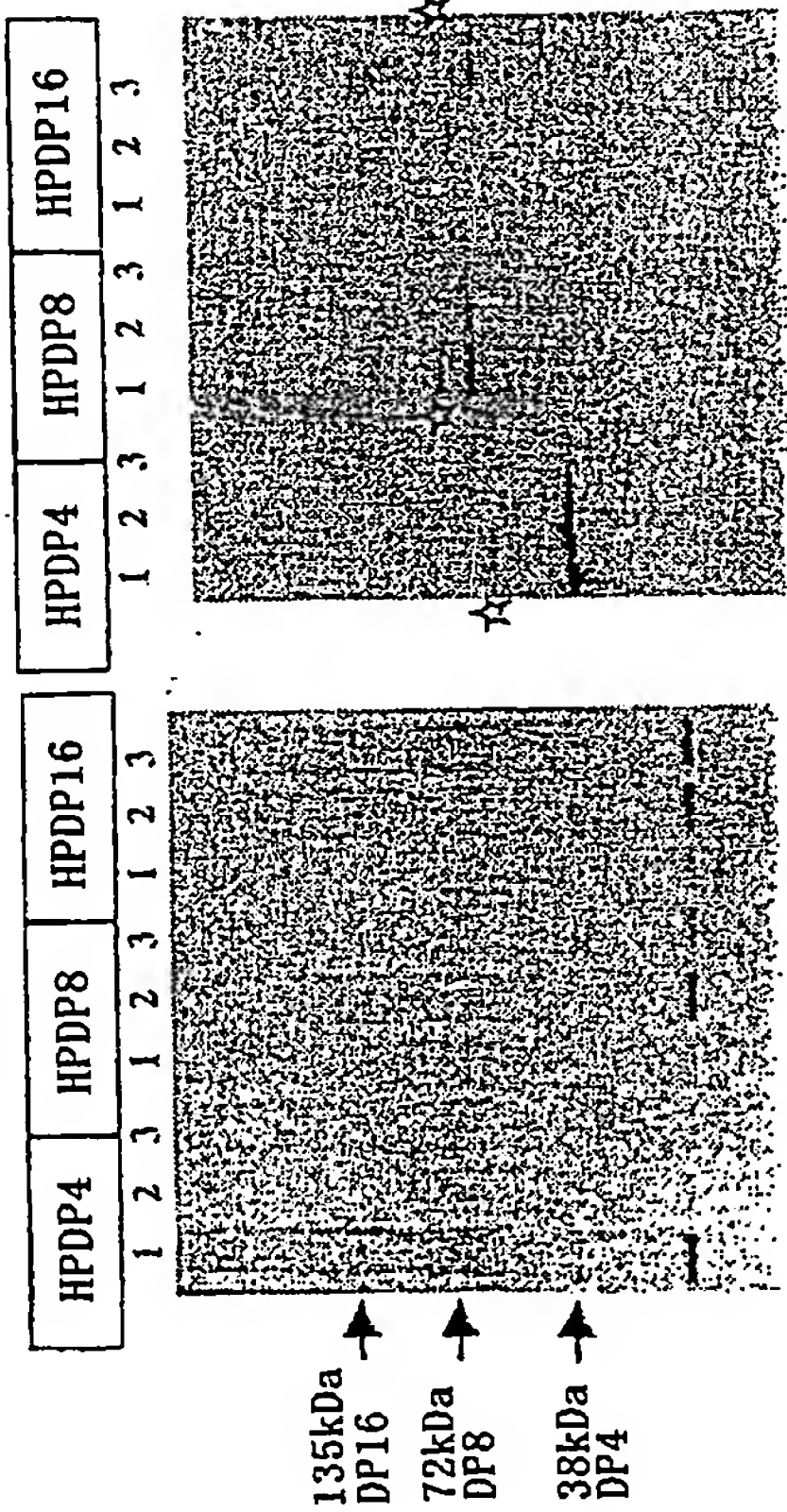
【図 4】

銀染色 ウエスタン解析(AEX)

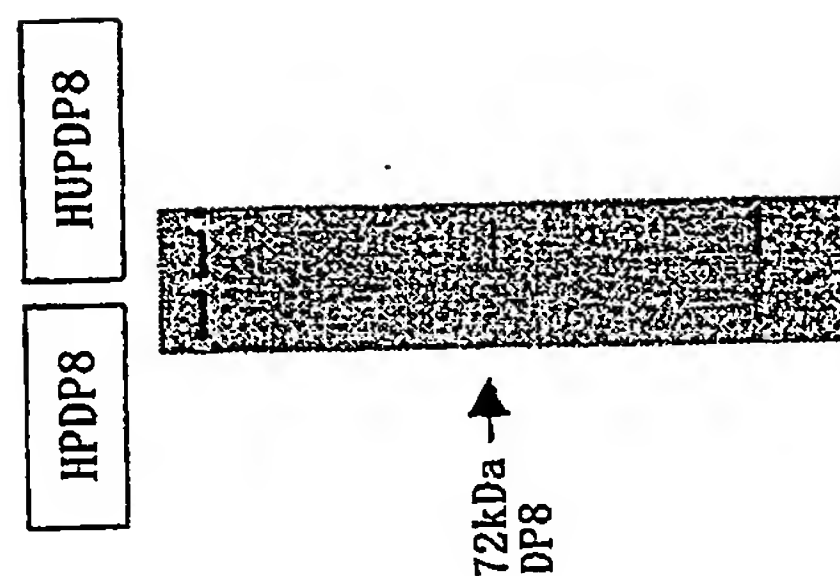


ウエスタン解析(DP)

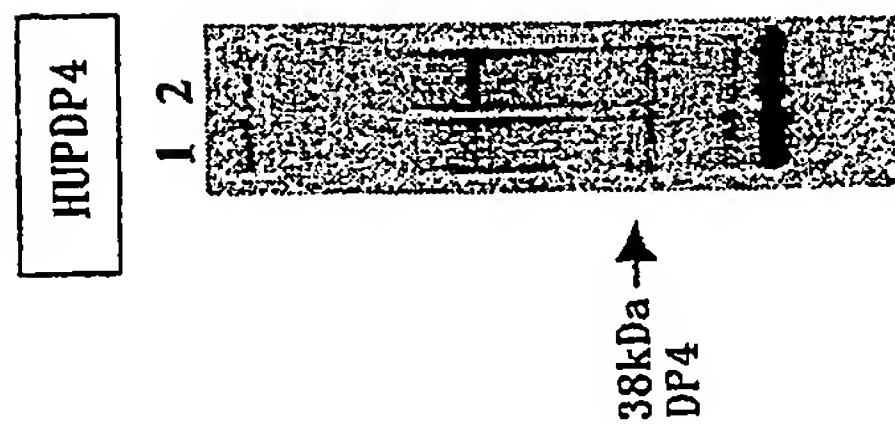
銀染色



銀染色



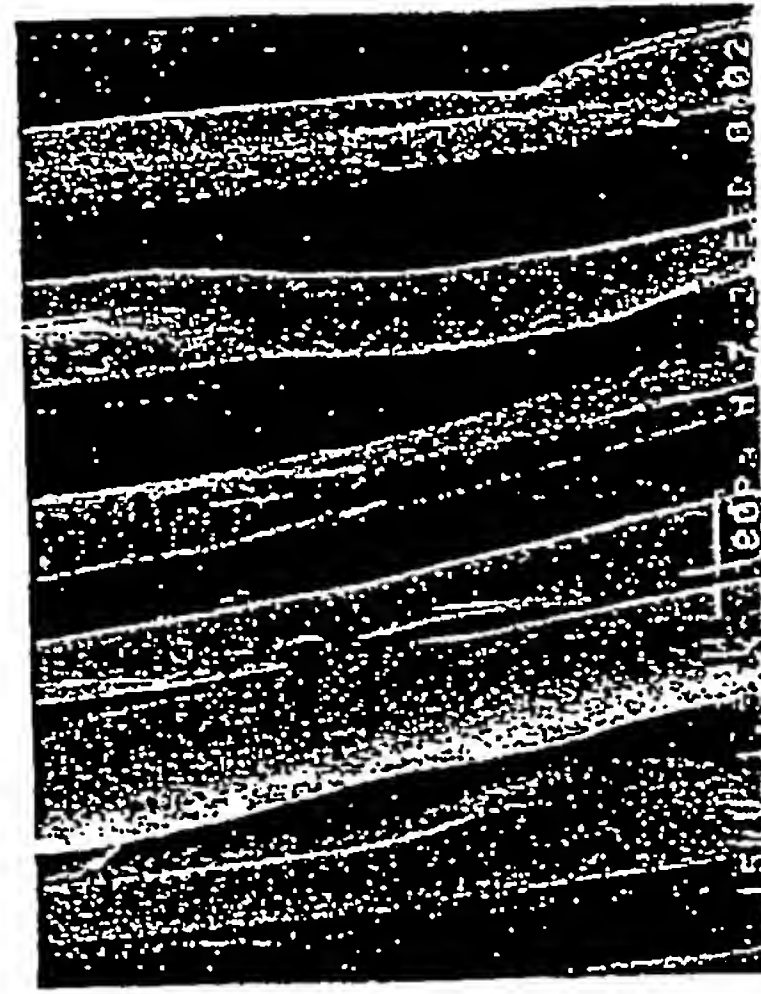
銀染色



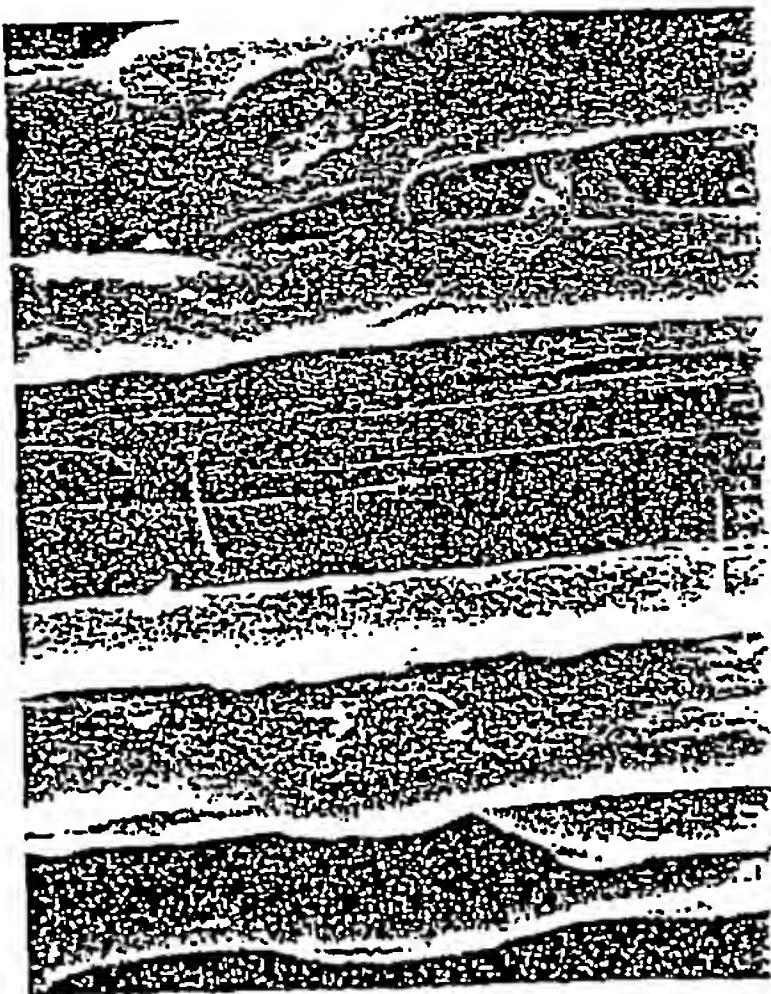
【図 5】



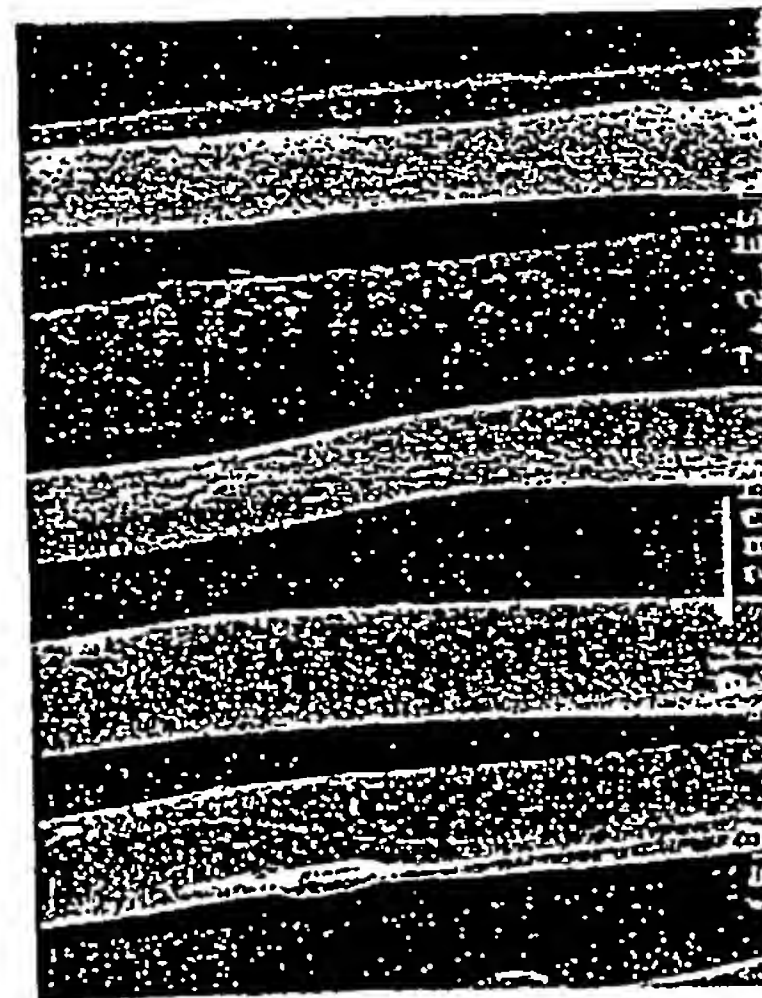
精練前HP-DP-HC絹糸



精練後HP-DP-HC絹糸

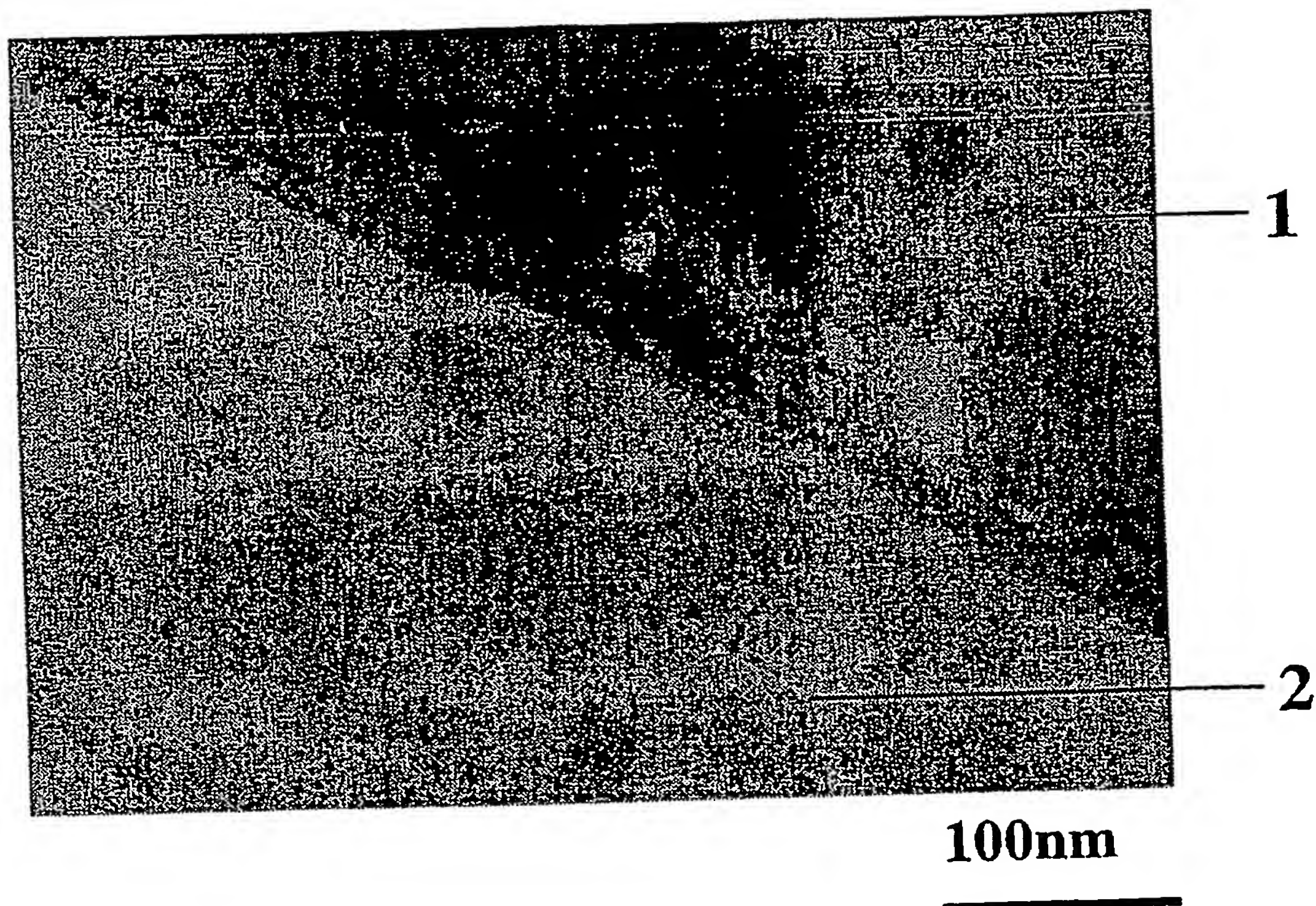


精練前非組換之絹糸

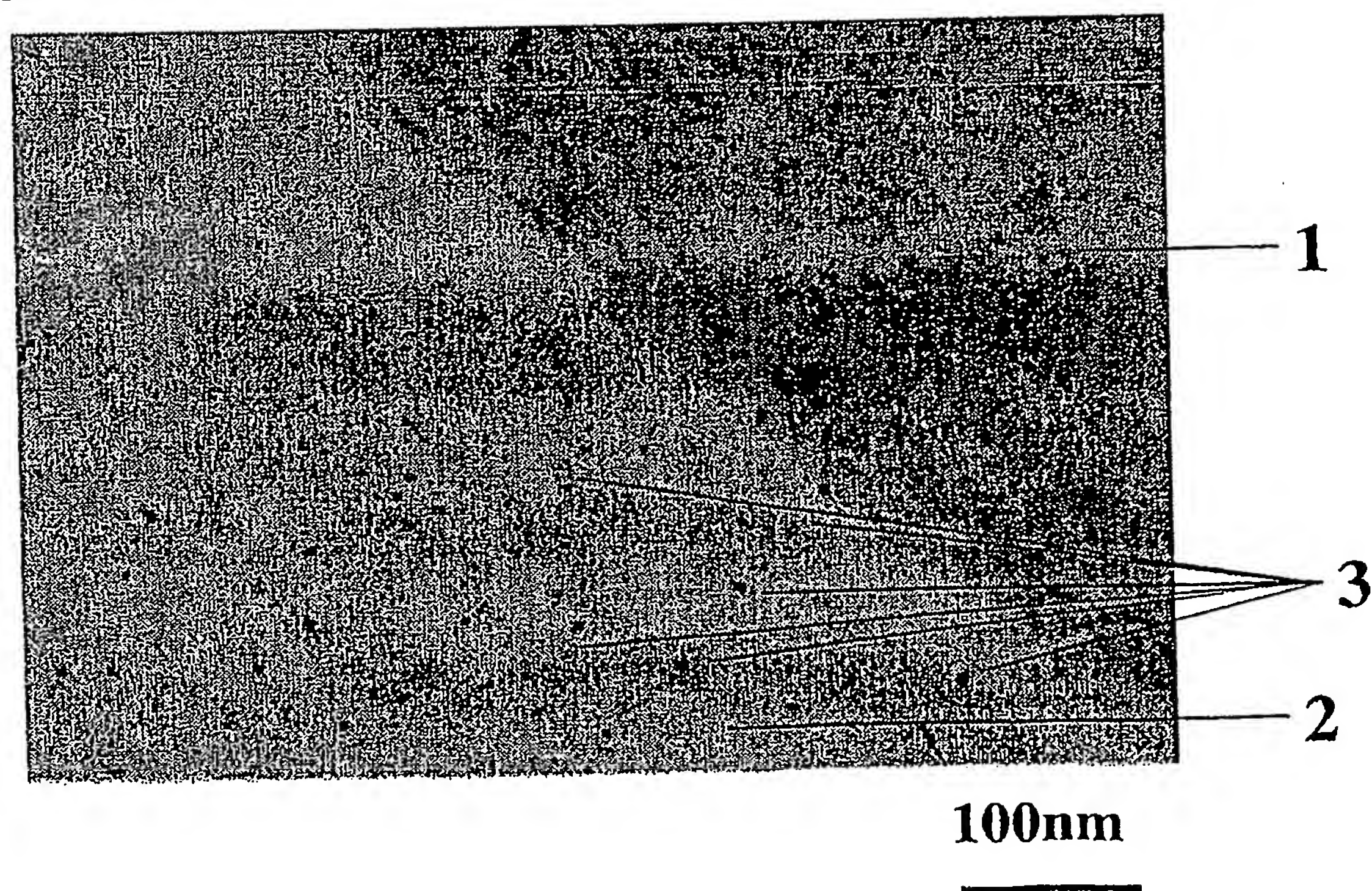


精練後非組換之絹糸

【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子組換えカイコを用い、遺伝子組換えカイコの作る絹糸の強度および伸度を低下させることなく、高強度、高伸度といったクモ糸タンパク質の持つ所望の性質を有する、クモ糸タンパク質を含んだ絹糸を提供することを課題としている。

【解決手段】 トランスポゾンの機能を用いることで、カイコフィブロインH鎖遺伝子を損なうことなく、高強度、高伸度といった所望の性質を持つクモ糸タンパク質をコードする遺伝子を導入し、所望の性質を持つクモ糸タンパク質を遺伝子組換えカイコに產生させ、所望の性質を有したクモ糸と絹糸のハイブリッドシルクを產生させる。このハイブリッドシルクは種々の産業用途への利用が可能である。

【選択図】 なし

特願 2004-005489

出願人履歴情報

識別番号

[000003159]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2002年10月25日
住所変更
東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
東レ株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 0 5 4 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 2 3 6 7 4]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 1 1 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミントン、マーケット
・ストリート 1 0 0 7

氏 名

イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー